

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

09/142052

PCT/JP97/01084

6

4.05.97

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

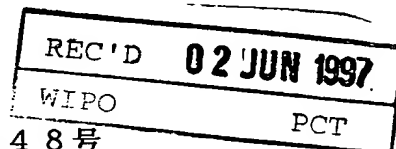
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1996年 3月29日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 8年特許願第103548号



出 願 人  
Applicant (s):

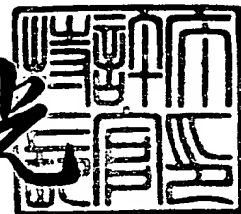
日本ゼオン株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年 5月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3030490

【書類名】 特許願

【整理番号】 PNZ96-0048

【提出日】 平成 8年 3月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 新規な融合タンパク質、その遺伝子、組み換えベクター、及び組み換えウイルスとその利用

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区夜光1-2-1 日本ゼオン株式会社 総合開発センター内

【氏名】 斉藤 修治

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区夜光1-2-1 日本ゼオン株式会社 総合開発センター内

【氏名】 津崎 芳成

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区夜光1-2-1 日本ゼオン株式会社 総合開発センター内

【氏名】 柳田 昇

【特許出願人】

【識別番号】 000229117

【氏名又は名称】 日本ゼオン株式会社

【代表者】 中野 克彦

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 033684

【納付金額】 21,000円

特平 8－103548

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な融合タンパク質、その遺伝子、組み換えベクター、及び組み換えウイルスとその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドとヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドとを含む融合タンパク質であって、外膜タンパク質由来のペプチドがマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドのN末端側に連結していることを特徴とする融合タンパク質。

【請求項2】 融合外膜タンパク質が、鳥類に感染性を示すヘルペスウイルス由来である請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項3】 融合外膜タンパク質が、マレック病ウイルス由来である請求項2記載の融合タンパク質。

【請求項4】 融合外膜タンパク質が、マレック病ウイルス由来gBタンパク質である請求項3記載の融合タンパク質。

【請求項5】 融合外膜タンパク質が、ヘルペスウイルス由来の膜タンパク質のシグナル配列部分である請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項6】 融合外膜タンパク質が、鳥類に感染性を示すヘルペスウイルス由来の膜タンパク質のシグナル配列部分である請求項5記載の融合タンパク質。

【請求項7】 シグナル配列部分が、マレック病ウイルスの外膜タンパク質由来のシグナル配列部分である請求項5記載の融合タンパク質。

【請求項8】 融合外膜タンパク質が、マレック病ウイルス由来gBタンパク質のシグナル配列部分である請求項5記載の融合タンパク質。

【請求項9】 請求項1～8記載の融合タンパク質をコードするハイブリッドDNA。

【請求項10】 請求項1～8記載の融合タンパク質をコードするDNAを組み込んだ組み換えベクター。

【請求項11】 請求項1～8記載の融合タンパク質をコードするDNAを

組み込んだ組み換えアビボックスウイルス。

【請求項12】 請求項1～8記載の融合タンパク質をコードするDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスを有効成分とした抗家禽マイコプラズマガリセプティカム感染症用組み換え生ワクチン。

【請求項13】 請求項3または4記載の融合タンパク質をコードするDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスを有効成分とした抗家禽マイコプラズマガリセプティカム感染症、および抗マレック病感染症用組み換え三価生ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、マイコプラズマ・ガリセプティカム抗原性ポリペプチドとヘルペスウイルス属外膜タンパク質由来のポリペプチドとの融合タンパク質、当該融合タンパク質をコードするハイブリッドDNA、及び当該ハイブリッドDNAを含有する組み換えアビボックスウイルスと、それを利用したワクチンに関する。

【0002】

【従来の技術】

マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*; 以下、MGという) は鶏を含む家禽の産卵率低下や孵化率低下の原因菌であり、全世界に広く蔓延しており、養鶏業界に多大なる被害を及ぼしている。現在、その予防方法として不活化ワクチンや生ワクチンが利用されているが、前者の場合は接種方法が煩雑であったり、免疫持続期間が短く、高価であるなどの欠点がある。後者は、他の生ワクチンの併用によって予期せぬ疾病が現れる欠点がある。また、不活化ワクチン、生ワクチンともにMG感染の迅速な検出方法であるMG凝集反応を使えないデメリットがある。

【0003】

そこで、MGの感染防御抗原タンパク質などの、MG由来のタンパク質を遺伝子工学的技術で生産させてワクチンとして利用することが期待されている。

MG抗原の遺伝子工学的製造は、大腸菌や酵母を用いた系 (特開平2-111

795公報など)では、発現させるタンパク質の種類によっては発現量が少ない他、宿主由来のタンパク質の混入や発熱性物質の除去が難しいなどの問題が指摘されている。このため、組み換えウイルスを用いた抗原タンパク質の製造や組み換え生ワクチンの研究が進められている。

組み換えウイルスによる異種遺伝子の発現例は、多くの場合、真核生物の遺伝子もしくはウイルス遺伝子を発現させているため、糖鎖の付加や発現様式などが感染細胞のタンパク発現メカニズムと同じで、*in vivo*における発現タンパク質にたいする抗体価の誘導が比較的容易であった。しかし、原核生物遺伝子を組み換えウイルスで発現させた例は少なく、真核生物との発現様式の違いから効果的に特異抗体を誘導するとは言い難かった(Austenら、*Protein Targeting and Selection*, Oxford Univ. Press. (1991))。

#### 【0004】

また、MGに関しては、当該タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスは、特開平5-824646号公報、特開平7-133295号公報、WO94/23019号公報等で知られている。なかでも、WO94/23019号公報には、ニューカッスル病ウイルス(以下、NDVという)のHN遺伝子のシグナル膜アンカー部分の遺伝子とMG抗原遺伝子を繋げてウイルス膜アンカー領域を持つMG抗原タンパク質を発現する組み換えウイルスを、組み換え生ワクチンとして接種するとMG抗原遺伝子単独を発現する組み換えウイルスより効率よく抗体を誘導することが確認されている。

しかしながら、この程度では十分なワクチン効果は必ずしも期待できない。

従って、さらに抗原認識性を上げる方法を見出すことが、効果的な抗MG感染症用ワクチンの開発に急務である。

#### 【0005】

ところで、外膜タンパク質は、前述したNDV以外にも、ヘルペスウイルス属などにおいても、外膜タンパク質が知られている。例えば、単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質B(gB)、C(gC)、D(gD)、H(gH)、I(gI)やマレック病ウイルス(以下、MDVという)の単純ヘルペスウイルス糖タン



パク質B、C、D、H、Iに相当するgBh、gCh、gDh、gHh、gIh、及び上記タンパク質とホモロジーを有するヘルペスウイルス属のタンパク質などは、その塩基配列やアミノ酸配列も知られている。また、これらのタンパク質の一部は単純ヘルペスウイルスの中和抗体を誘導する事が知られている（De lucaら、Virology、122、411-423（1982））。また、これらのタンパク質をコードする遺伝子をワクシニアウイルスに組み込んで、発現させることにより中和抗体を誘導する事も知られている（Blacklawら、Virology、177、727-736（1990））。

しかしながら、これらヘルペスウイルス属の外膜タンパク質のシグナル配列を活用することは十分に検討されていなかった。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、かかる従来技術の下で、高い感染防御活性を有するマイコプラズマ抗原タンパク質を大量に発現し、宿主側に高度に抗原認識させることのできる組み換えウイルスを得るべく鋭意努力した結果、ヘルペスウイルス属の外膜タンパク質DNAにマイコプラズマ抗原タンパク質DNAを連結させたハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスを、宿主に感染させることにより宿主側の抗原認識能を飛躍的に向上させ得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

かくして本発明によれば、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチド（以下、マイコプラズマ由来のポリペプチドということがある）とヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチド（以下、ヘルペスウイルス由来のポリペプチドということがある）とを含む融合タンパク質であって、外膜タンパク質由来のポリペプチドがマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドのN末端側に連結していることを特徴とする融合タンパク質、当該融合タンパク質をコードするハイブリッドDNA、当該ハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルス、および当該組み換えアビボ

ックスウイルスを有効成分とする生ワクチンが提供される。

以下に、本発明を詳述する。

【0008】

(マイコプラズマ由来のポリペプチドとその遺伝子)

ここで、マイコプラズマ由来のポリペプチドとは、MG免疫血清またはMG感染血清と抗原抗体反応を呈し、MGに由来する抗原タンパク質であるが、これらは天然のマイコプラズマ・ガリセプティカムが発現するタンパク質そのものである必要はなく、例えば1または2以上のアミノ酸が自然に、または人工的に例えば位置特異的変異など公知の手法（特公平6-16709号公報など）により欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾を受けているタンパク質であってもよい。もちろんこのような変異によっても抗原性を示すエピトープが含まれていることは必要である。尚、エピトープ領域の決定は、ペプスキャン法に基づくGeyssenらの方法（J. Immunol. Meth., 102, 259-274 (1987)）、Hoppらの方法（Proc. Natl. Acad. USA, 78, 3824-3828 (1981)）、Chouらの方法（Advances in Enzymology 47, 145-148 (1987)）など公知の方法を用いることができる。

【0009】

このような抗原性を有するペプチドの具体例として特平開1-111795号公報、特開平5-824646号公報、WO94/23019号公報に記載された抗原タンパク質やそのタンパク質のアミノ酸配列を含むマイコプラズマ・ガリセプティカムのタンパク質などが例示され、もちろん、エピトープが含まれる限りこれらの一部であってもよい。

これらのなかでも、特開平5-824646号公報に記載されている約40キロダルトンのポリペプチド、特表平6-521927号公報に記載されている約66キロダルトンのTM-66遺伝子によってコードされたポリペプチド（当該公報の配列番号16）や約67キロダルトンのTM-67遺伝子によってコードされたポリペプチド（当該公報の配列番号27）などが好ましい。

【0010】

本発明においてマイコプラズマ由来のポリペプチドの遺伝子は、上述したマイコプラズマ・ガリセプティカム抗原性を有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むものであり、このようなDNAは、合成するか、または天然のマイコプラズマ・ガリセプティカムに属する細菌（具体例としてはR株、S6株、KP-13株、PG31株など）などから得ることができる。野外から分離されたMG由来のDNAでもよい。もちろん、これらの遺伝子を公知の手法（Methods in Enzymologyなど）により欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾をしてもよい。

【0011】

（ヘルペスウイルス由来のポリペプチドとその遺伝子）

本発明で言うヘルペスウイルス由来のポリペプチドとは、ヘルペスウイルス属ウイルスのエンベロープを構成するタンパク質由来のポリペプチドであるが、このタンパク質全長である必要はなく、融合タンパク質として細胞膜に呈示させることのみを目的とする場合は、膜アンカーとシグナル配列を含み、分泌を目的とする場合などはシグナル配列のみであってもよい。また、外膜タンパク質はタイプI外膜タンパク質、タイプIIの外膜タンパク質のどちらでもよく、そのシグナル配列、膜アンカー配列はアミノ末端もしくはカルボキシル末端の疎水性ペプチド領域のアミノ酸配列を解析する事により、容易に見いだすことが可能である。

外膜タンパク質の具体例としては、例えば、単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質gB、gC、gD、gH、gIやマレック病ウイルス（以下、MDVという）の単純ヘルペスウイルス糖タンパク質gB、gC、gD、gH、gIに相当するgBh、gCh、gDh、gHh、gIh、及び上記タンパク質とホモロジーを有するヘルペスウイルス属のタンパク質等が挙げられる。

もちろん、外膜タンパク質のシグナル配列以外のエピトープを含むポリペプチドを前記抗原性を有するポリペプチドに連結させれば、このエピトープが生体内で生体に免疫を付与することも期待できる。

【0012】

本発明においてマイコプラズマ由来のポリペプチドの遺伝子は、上述したヘル

ヘルペスウイルス由来のポリペプチドをコードするDNA配列を含むものであり、このようなDNAは、合成するか、または天然のヘルペスウイルスから得ることができる。もちろん、これらの遺伝子を公知の手法 (Methods in Enzymology など) により欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾をしてもよい。

【0013】

(融合タンパク質とハイブリッドDNA)

本発明の融合タンパク質は、後述するハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビポックスウイルスを鶏胎児線維芽細胞 (以下、CEF細胞という) や発育鶏卵しょう尿膜細胞などにて培養し得ることができる。

得られた融合タンパク質は、コンポネントワクチンとして用いることも可能である。

【0014】

本発明のハイブリッドDNAは、上記該マイコプラズマ由来のポリペプチドの遺伝子とヘルペスウイルス由来のポリペプチドの遺伝子とが直接、又は任意のDNA配列を介して連結されたものである。

このハイブリッドDNAは、常法、例えばヘルペスウイルスの外膜タンパク質をコードするDNAまたは外膜タンパク質のシグナル配列をコードするDNAと、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質をコードするDNAとが結合可能な制限酵素切断断片となるようにし、両者をリガーゼで連結する方法や適当なリンカーを挟んで両DNAをリガーゼで連結する方法などによって作製される。

本発明の融合タンパク質のアミノ酸配列の具体的な例としては、配列番号2および4記載のものが例示される。マイコプラズマ・ガリセプティカム由来の40キロダルトンの抗原タンパク質の配列は、配列番号2中、第64～456番目、配列番号4中、第688～1081番目であり、配列番号2中、第1～63番目は、MDV由来の外膜タンパク質gBのシグナル配列であり、配列番号4中、第1～667番目は、MDV由来の外膜タンパク質gBのほぼ全長である。これらの融合タンパク質をコードするハイブリッドDNAの塩基配列の具体例としては

、配列番号1および3記載のものが例示される。

もちろん、本発明において融合タンパク質及びハイブリッドDNAはこれに限定されるものではない。

【0015】

(組み換えアビボックスウイルス)

本発明の組み換えアビボックスウイルスは、アビボックスウイルスの非必須領域に上述のハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスである。本発明の組み換えアビボックスウイルスの構築方法は常法に従えば良く、例えば特開平1-168279号公報に記載の方法に従えばよい。すなわち、まずアビボックスウイルスの非必須領域に組み込んだ第一の組み換えベクターが構築される。

【0016】

本発明で用いるアビボックスウイルスの非必須領域は、クエイルボックスウイルスのTK領域、七面鳥ボックスウイルスのTK遺伝子領域や特開平1-168279号公報に記載されたDNA断片が挙げられ、好ましくは、前記公報記載の約7.3KbのEcoRI断片、約5.2KbのHindIII断片、約5.0KbのEcoRI-HindIII断片、約4.0KbのBamHI断片と相同組み換えをおこす領域である。

本発明で用いるベクターとしては、例えばpBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC7、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19などのプラスミド、λファージ、M13ファージなどのファージ、pHC79などのコスミドなどが挙げられる。

【0017】

本発明で用いられるアビボックスウイルスは鳥類に感染するウイルスであれば特に限定されない。このようなウイルスの具体例としては、ピジョンボックスウイルス、フォウルボックスウイルス（以下、FPVという）、カナリーボックスウイルス、七面鳥ボックスウイルスなどが例示されるが、好ましくはピジョンボックスウイルス、FPV、七面鳥ボックスウイルス、より好ましくは、ピジョンボックスウイルス、FPVである。とりわけ好ましいアビボックスウイルスの具

体例としては、ATCC VR-251、ATCC VR-249、ATCC VR-250、ATCC VR-229、ATCC VR-229、ATCC VR-288、西ヶ原株、泗水株、CEVA株、CEVA株由来のウイルスのうち鶏胚線維芽細胞に感染したときに大きいプラークを形成するウイルス株などのときFPVや、NP株（鶏胎化鳩痘毒中野株）などのように鶏痘生ワクチン株として使用されるFPVと近縁のウイルスなどが例示される。これらの株はいずれも市販されているなど、容易に入手することができる。

【0018】

ついで、前記第一の組み換えベクターの非必須領域内に本発明のハイブリッドDNAを組み込んだ第二の組み換えベクターを構築する。通常、ハイブリッドDNAは、合成天然を問わず、アビポックスウイルスが保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能するものであればいかなる塩基配列のものでもよく、チミジンキナーゼをコードするアビポックスウイルス由来遺伝子のプロモーターなどのアビポックスウイルス固有のプロモーターはもちろんのこと、アビポックスウイルス以外のウイルス由来のDNAや真核生物、原核生物どちら由来のDNAであっても、上記条件を満たす限りにおいては当然本発明に使用可能である。このようなプロモーターの具体例としては、例えばJournal of Virology、51、662-669頁（1984年）に例示されるようなVVのプロモーター、具体的には7.5KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーター、19KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーター、42KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーター、チミジンキナーゼをコードするVV遺伝子のプロモーター、28KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーターなどが例示される。また、Mossらの文献J. Mol. Biol.、210、49-76頁、771-784頁、1989年）を参考にした合成プロモーター、Davidsonの合成プロモーターや、その一部をプロモーター活性が喪失しない範囲での削除、変更などにより改変されたもの（例えば、TTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAATAATAATACATAAATTAATTACGCGTAAAAATTGAAAACTATTCTAATTTATTGCACTC、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG

GCATATAAATAATAATACAATAATTAAATTACGCGT  
AAAAATTGAAAACTATTCTAATTTATTGCACTCなど  
)を用いることもできる。

【0019】

また、組み換えウイルスの検出が容易であるという点から、 $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードするDNAなどのマーカー遺伝子も組み込むことができる。  
組み換えアビポックスウイルスの作製は、予めアビポックスウイルスを感染させた動物培養細胞に上記の第二の組み換えベクターを移入し、ベクターDNAとウイルスゲノムDNAとの間で相同組み換えを起こさせればよい。ここで用いられる動物培養細胞は、アビポックスウイルスが増殖可能なものであればよく、その具体例としてはCEF細胞はや発育鶏卵しょう尿膜細胞などが例示される。

宿主細胞に感染しているウイルスからプラークハイブリダイゼーションなどの方法により目的とする組み換えアビポックスウイルスを単離する事ができる。

【0020】

(生ワクチン)

上記の方法によって構築された本発明の組み換えウイルスは抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンとして鳥類に接種することができる。

本発明の生ワクチンの調整方法は特に限定されないが、例えば、次の方法によって調製される。本発明の組み換えウイルスを該ウイルスが生育することができる細胞（以下、宿主細胞という）に感染させ、増殖させたのち、細胞を回収し、破碎する。この細胞破碎物を遠心分離によって沈殿物と組み換えウイルスを含有する高力価上清とに分離する。得られた上清は実質的に宿主細胞を含まず、細胞培養培地と組み換えウイルスを含んでおり、生ワクチンとして使用することができる。この上清には薬理学的に問題のないキャリアー、例えば生理食塩水などを添加し、希釈することもできる。また、この上清は凍結乾燥しても生ワクチンとして使用できる。本発明の生ワクチンの家禽への投与方法は特に限定されず、例えば皮膚に引っかき傷を付けて生ワクチンを接種する方法、注射により接種する方法、飼料や水に混合し経口投与する方法、エアロゾルやスプレーなどにより吸入させる方法などが挙げられる。生ワクチンとして使用するには、通常生ワクチ

ンの使用方法と同等でよく、例えばニワトリ一羽あたり $10^2$ から $10^8$ プラークフォーミングユニット（以下、PFUという）程度を接種する。注射による場合、通常0.1ml程度の生理食塩水などの等張溶媒に本発明の組み換えウイルスを懸濁して用いることができる。本発明の生ワクチンは、ふつうの条件下では凍結乾燥すればよく、室温での保存が可能である。また、ウイルスの懸濁液を $-20$ から $-70^{\circ}\text{C}$ 下で凍結させ保存する事も可能である。

#### 【0021】

特に、前記ヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドをコードする遺伝子が、ヘルペスウイルスのエピトープが1以上、好ましくは天然の外膜タンパク質との相同性が90%以上のポリペプチドをコードするものである場合、本発明の生ワクチンは、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症とアビポックスウイルス感染症に対するワクチンとして機能するのほか、外膜タンパク質の由来となるヘルペスウイルスの感染症に対しても有効なワクチンとして機能する、いわゆる三価のワクチンとして用いることができる。

#### 【0022】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質由来のポリペプチドとヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドとの融合タンパク質が得られ、この融合タンパク質は抗マイコプラズマ感染症、抗鶏痘、抗マレック病ワクチンとして有用である。また、当該融合タンパク質をコードするハイブリッドDNAを利用することにより、マイコプラズマ・ガリセプティカム抗原タンパク質を宿主細胞表面に効率よく提示するばかりでなく、細胞外に分泌して宿主の抗原認識担当細胞に効果的に認識されるアビポックスウイルスが得られ、該組み換えアビポックスウイルスは強力な抗マイコプラズマ感染症ワクチンとして有用である。

#### 【0023】

##### 【実施例】

（実施例1）マレック病ウイルスのgB遺伝子のシグナル直後へTTM-1タンパク質DNAが連結したハイブリッドDNAを有する組み換えpNZ40K-S



の構築 (図1、2、3 参照)

まず、特開平6-78764号公報に開示されている、マレック病ウイルスのgB遺伝子を含むプラスミドpUCgBを制限酵素BamHIとSalIで切断し、3.9kbの断片を回収した。

これとは別に、pUC18のHindIII-SalI部位にプラスミドpNZ1729R (Yanagidaら、J. Virol.、66、1402-1408 (1992)) をHindIIIとSalIとで消化して得られた約140bpのDNA断片を挿入し、さらにHindIII-PstI部位に合成DNA (5'-AGCTGCCCCCCCCGGCAAGCTTGCA-3') を挿入し、次にSalI-EcoRI部位に合成DNA (5'-TCGACATTTTATGTGTAC-3') を挿入し、最後にSacI-EcoRI部位に合成DNA (5'-AATCGGCCGGGGGGGCCAGCT-3') を挿入して、プラスミドpGTPsを構築した。

得られたpGTPsを制限酵素SalIとBamHIで開裂させ、リガーゼで前出の3.9kbの断片と連結し、pGTPsMDgBを取得した。次に、WO94/23019号公報特許に開示のpNZ2929XM1をEcoRIで切断し、740bpの断片を回収したのちT4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化した。pGTPsMDgBもXbaIで開裂させた後、T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、末端平滑化した740bp断片とリガーゼによって連結して、新たなプラスミドを構築した。この新たなプラスミドをBglIIとSalIで切断して3.0kbの断片を回収し、pNZ2927XM1のBglIIとSalIで切断した1.1kbの断片とリガーゼによって連結し、マレック病ウイルスのgB遺伝子のシグナル配列部分のC末端にTTM-1遺伝子のN末端が連結したプラスミドが得られた。

最後に、pGTPs40K-SをSalIとBamHIで切断した1.4kbを、SalIとBamHIで開裂させたプラスミドpNZ1829R断片 (9.3kb) とリガーゼによって連結し、目的の組み換え用プラスミドpNZ40K-S (10.7kb) を取得した。

【0024】

(実施例2) マレック病ウイルスのgB遺伝子のC末にTTM-1タンパク質DNAが連結したハイブリッドDNAを有する組み換え用プラスミドpNZ40K-Cの構築(図4、5、6参照)

実施例1のプラスミドpGTPsMDgBを制限酵素MluIで切断後、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化した。そのあとに制限酵素XbaIで切断して、1.9kbの断片を回収した。また、ファージミッドベクターpBluescriptII(東洋紡績株式会社製;以下、pBSKSI Iという)を制限酵素XbaIとSmaIで開裂後、先ほどの1.9kbの断片とリガーゼによって連結したプラスミドを取得した。つぎにこのプラスミドを制限酵素EcoRIとSalIで開裂後、pNZ2929XM1を制限酵素EcoRIとSalIで切断した550bp断片および、EcoT22IとSalIで切断した615bp断片とリガーゼによって連結したプラスミドを取得した。このプラスミドを制限酵素XbaIとSalIで切断した2.7kbの断片と、pGTPsMDgBを制限酵素XbaIとSalIで切断した3.3kbの断片とをリガーゼによって連結し、マレック病ウイルスのgB遺伝子のC末端にTTM-1遺伝子のN末端が連結したプラスミドpGTPs40K-Cが得られた。

最後に、pGTPs40K-CをSalIとXbaIで切断した2.7kbを、SalIとXbaIで開裂させたプラスミドpNZ1829R断片(9.5kb)とリガーゼによって連結し、目的の組み換え用プラスミドpNZ40K-C(12.2kb)を取得した。

#### 【0025】

実施例3 組み換えFPV 40K-C、40K-Sの作製と純化

単層のCEFに鶏痘生ワクチン株であるNP株をm. o. i. = 0.1で感染させて、3時間後にこれらの細胞をトリプシン処理で剥がし、細胞懸濁液とした。この懸濁液中の $2 \times 10^7$ 個の細胞と10 $\mu$ gの組み換え用プラスミドpNZ40K-CまたはpNZ40K-Sと混合し、Saline G(0.14M塩化ナトリウム、0.5mM塩化カリウム、1.1mMリン酸一水素二ナトリウム、1.5mMリン酸二水素一カリウム、0.5mM塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース)に懸濁し、室温においてジーンパルサー(Bio-

Rad社製)を用いて $3.0\text{KVcm}^{-1}$ 、 $0.4\text{msec}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ の条件下でエレクトロポレーションした。プラスミドを導入した細胞を、その後 $37^{\circ}\text{C}$ 、72時間培養し、3回の凍結融解によって細胞を溶解し、組み換えウイルスを含むウイルスを回収した。

【0026】

回収した組み換えウイルスは、次のようにして選択した。回収したウイルス液を単層のCEFに感染させ、生育培地を含んだ $10\text{ml}$ の寒天溶液を重層した。室温中で寒天を温めたのち、FPVのプラークが出現するまで $37^{\circ}\text{C}$ で培養後ブルオギャル(Bluo-gal)を $200\mu\text{g/ml}$ の濃度で含んだ寒天溶液を重層し、さらに48時間 $37^{\circ}\text{C}$ で培養した。全プラークのうち約1%のプラークが青く発色した。これらの青いプラークを単離回収して、さらに同様の操作を繰り返して全てのプラークが青く染まるまでウイルスの純化を行った。通常この繰り返しは3~4日で終了する。この純化されたウイルスをそれぞれ40K-C、40K-Sと名付けた。40K-C、40K-Sはドットブロットハイブリダイゼーション、サザンブロットハイブリダイゼーションによって組み込んだ各DNAの位置を確認した。

【0027】

実施例4 40K-C、40K-S感染細胞におけるTTM-1ポリペプチドの発現

40K-C及び40K-SがTTM-1ポリペプチドを感染細胞中で発現することを調べるために、抗マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株血清を用いたウェスタンブロッティング法を行った。40K-Cまたは40K-SをCEFに感染させ、 $37^{\circ}\text{C}$ でプラークが出現するまで培養後、セルスクレーパーによって細胞をはがし取り培養上清とともに $8000\text{G}$ 、20分間遠心し、細胞を含む沈さ(以下、ペレットという)を回収した。さらに、ペレットをPBSで洗浄後、 $8000\text{G}$ 、20分間遠心し、洗浄した細胞を含むペレットを回収した。このペレットを $150\mu\text{l}$ のPBSで懸濁し、そのうちの $50\mu\text{l}$ に等量のレムリバッファー(10%メルカプトエタノールを含む)を加え、3分間煮沸処理したのち、Laemmliの方法(Nature, 227, 668-685 (1970))

）に従い、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGEという）に付した。SDS-PAGEを終了したゲルで分離したポリペプチドをBurnett等（A. Anal. Biochem.、112、195-203（1970））やTowbin等の方法（Proc. Natl. Acad. Sci.、75、4350-4354（1979））に従ってポリビニリデンジフルオロライド膜（Immobilon Transfer Membrane（ミリポア社）；以下、メンブレンという）に電気泳動によって移行させた。メンブレンは、3%のスキムミルクを含むPBSに1時間浸せきして、非特異結合が起きないようにブロッキングし、次に鶏抗マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株血清を1000倍に希釈したPBSに1時間浸せきした。

【0028】

次に、PBSでメンブレンをすすいだ後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼコンジュゲート抗鶏IgGを含むPBSに1時間浸せきした。PBSでメンブレンをすすいだ後、発色基質としてニトロブルーテトラゾリウム塩（NBT）（GIBCO-BRL社製）と、5-ブロモ-4-クロロ3-インドールフォスフェイト-プートルイジン塩（BCIP）（GIBCO-BRL社製）を用い、反応液（100mMトリス塩酸（pH7.5）、0.15M塩化ナトリウム、50mM塩化マグネシウム）10m中で発色反応を行った。

ウェスタンブロットの結果を図7に示す。

図7に示すとおり、40K-S、40K-C感染細胞ともに、目的の位置に反応するタンパク質が確認でき、組み換えFPV感染細胞で予想通りのタンパク質を発現していることを確認できた。

【0029】

実施例5 組み換えFPV接種鶏の抗体誘導能

40K-C及び40K-SをCEFで37℃、48時間培養後、二回凍結融解を繰り返し、細胞浮遊液を回収し、ウイルスタイターが、 $10^6$  pfu/mlとなるように調製したのち、生後7日のSPF鶏（Line M、日本生物科学研究所）の右翼膜に穿刺用針で10μl接種した。接種後善感発痘を観察し、接種から二週後に血清を採取した。採取した血清の抗体価はELISA法で測定した

。精製したTTM-1ポリペプチドを $1\mu\text{g}/\text{well}$ となるようにバイカーボネイトバッファーに溶解し、96wellマイクロタイタープレートに吸着させた後、スキムミルクでブロッキングを行ってその後の非特異的吸着を防いだ。次に各ウェルに被検血清の希釈液をのせた後ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ結合抗鶏イムノグロブリン抗体（ウサギ抗体）としてのせた。十分洗浄した後、基質として2, 2'-アジノジエチル-ベンズチアゾリンスルフォネートを加え、イムノリーダーで405nmの波長光に対する吸光度で抗体の相対希釈倍率を測定した。なお、対照一次抗体には、抗TTM-1ポリペプチド鶏血清を用いた。

【0030】

【表1】

表1 rFPV接種鶏血清のELISA抗体価

鶏の処理方法	抗TTM-1抗体価
40K-S接種	1,024
40K-C接種	512
TTM-1免疫	512
非接種	1

抗体価は非接種鶏群の抗体価を1とした場合の血清の希釈倍率

【0031】

表1に示すとおり、40K-Cまたは40K-Sを接種した鶏の血清中の抗TTM-1抗体価は、TTM-1ポリペプチドを免疫した鶏血清抗体価より上昇した。このことから、組み換えFPVは接種鶏に有意に抗体価を誘導することが確かめられた。

【0032】

実施例-6 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は基本的に動物用生物学的製剤基準に従った。以下、簡単にその方法を記述する。

試験用SPF鶏（Line M、日本生物科学研究所）が5週齢のときに40

K-C及び40K-Sを右翼膜に穿刺用針で $10\mu l$ 接種した。接種後善感発痘を観察し、免疫が成立したことを確認した。接種後2週目にマイコプラズマガリセプティカムR株を $10^4\sim 10^5$ cfu/羽となるように気管内に強制投与し、感染を成立させた。感染14日後にネンブタールで屠殺剖検し、気管の病理組織標本を作製し、気管粘膜の厚さと、組織所見をもとに気管病変スコアを測定した。スコアの基準も製剤基準に則り、群内の各鶏の気管病変スコアの平均を各群のスコアとした。参考までに、気管病変スコアの判定基準を表2に記す。

【0033】

【表2】

表2 気管病変スコアの判定基準

粘膜の厚さ	組織所見	スコア
90mm以上	正常なもの	0
90mm以上	粘膜固有層に円形細胞の軽度な浸潤あるいは微少集簇巣を認めるが、上皮細胞は正常なもの	1
110mm未満	上皮細胞は変性あるいは脱落し、粘膜固有層は円形細胞の浸潤により中程度に肥厚しているもの	2
110mm以上	上皮細胞は変性あるいは脱落し、粘膜固有層は毛細血管の増生及び円形細胞の浸潤により高度に肥厚し、腔内には細胞崩壊産物の堆積が認められるもの	3

【0034】

判定結果を表3および図8に示した。

【0035】

【表3】

表3 rFPV接種鶏気管病変平均スコア

鶏の処理方法	病変 スコア	
	平均	標準誤差
40K-S接種	1.38	0.16
40K-C接種	1.89	0.13
市販ワクチン免疫	2.11	0.24
TTM-1ポリペプチド免疫	1.09	0.23
非接種	2.27	0.21

## 【0036】

この結果から明らかなように、40K-C及び40K-Sを接種した鶏の病変スコアは非接種鶏に比べて明らかに低く、マイコプラズマチャレンジに対して明らかな感染防御能を鶏に付与していることがわかった。このことから、40K-C及び40K-Sはマイコプラズマガリセプティカムに対する有効なワクチンとなりうることがわかった。

## 【0037】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1372

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 ハイブリッドDNA (40K-S)

## 配列

ATG CAC TAT TTT AGG CGG AAT TGC ATA TTT TTC CTT ATA GTT ATT CTA 48

Met	His	Tyr	Phe	Arg	Arg	Asn	Cys	Ile	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Leu	
1				5					10					15		
TAT	GGT	ACG	AAC	TCA	TCT	CCG	AGT	ACC	CAA	AAT	GTG	ACA	TCA	AGA	GAA	96
Tyr	Gly	Thr	Asn	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Thr	Ser	Arg	Glu	
			20					25					30			
GTT	GTT	TCG	AGC	GTC	CAG	TTG	TCT	GAG	GAA	GAG	TCT	ACG	TTT	TAT	CTT	144
Val	Val	Ser	Ser	Val	Gln	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Thr	Phe	Tyr	Leu	
			35					40					45			
TGT	CCC	CCA	CCA	GTG	GGT	TCA	ACC	GTG	ATC	CGT	CTA	GAA	TTC	GGC	TGT	192
Cys	Pro	Pro	Pro	Val	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Cys	
			50					55					60			
ATG	TCT	ATT	ACT	AAA	AAA	GAT	GCA	AAC	CCA	AAT	AAT	GGC	CAA	ACC	CAA	240
Met	Ser	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Thr	Gln	
65				70					75				80			
TTA	GAA	GCA	GCG	CGA	ATG	GAG	TTA	ACA	GAT	CTA	ATC	AAT	GCT	AAA	GCG	288
Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Asn	Ala	Lys	Ala	
				85					90				95			
ATG	ACA	TTA	GCT	TCA	CTA	CAA	GAC	TAT	GCC	AAG	ATT	GAA	GCT	AGT	TTA	336
Met	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ala	Ser	Leu	
			100						105				110			
TCA	TCT	GCT	TAT	AGT	GAA	GCT	GAA	ACA	GTT	AAC	AAT	AAC	CTT	AAT	GCA	384
Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ala	Glu	Thr	Val	Asn	Asn	Asn	Leu	Asn	Ala	
			115					120					125			
ACA	TTA	GAA	CAA	CTA	AAA	ATG	GCT	AAA	ACT	AAT	TTA	GAA	TCA	GCC	ATC	432
Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Lys	Met	Ala	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	
			130					135					140			
AAC	CAA	GCT	AAT	ACG	GAT	AAA	ACG	ACT	TTT	GAT	AAT	GAA	CAC	CCA	AAT	480
Asn	Gln	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Asn	Glu	His	Pro	Asn	
145				150					155				160			



TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT GCT	528
Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg Ala	
165 170 175	
ACT AAC CTT GAA GGT TTG TCA TCA ACT GCT TAT AAT CAA ATT CGC AAT	576
Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg Asn	
180 185 190	
AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAA GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA ACA	624
Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys Thr	
195 200 205	
CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ACG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT ACT	672
Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile Thr	
210 215 220	
ACA GCT AAT AAG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA CAA	720
Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu Gln	
225 230 235 240	
AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG ATT	768
Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val Ile	
245 250 255	
CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT GTT	816
Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn Val	
260 265 270	
CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA CCC	864
Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr Pro	
275 280 285	
GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT TGG AAT GGT GAT GAA CCT	912
Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Trp Asn Gly Asp Glu Pro	
290 295 300	
TCA AGT AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT ATC ACA GAT GTT TCT TGG	960
Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser Trp	

305	310	315	320	
ATT TAT AGT TTA GCT GGA ACA AAC ACG AAG TAC CAA TTT AGT TTT AGC				1008
Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe Ser				
	325	330	335	
AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG GTT				1056
Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu Val				
	340	345	350	
AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA CAA TAC AAA TTA AAT AAT				1105
Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn Asn				
	355	360	365	
GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT TCA ACT AGT GCA AAT AAT				1153
Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn Asn				
	370	375	380	
ACT ACA GCT AAT CCA ACT CCA GCA GTT GAT GAG ATT AAA GTT GCT AAA				1201
Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp Glu Ile Lys Val Ala Lys				
385	390	395	400	
ATC GTT TTA TCA GGT TTA AGA TTT GGC CAA AAC ACA ATC GAA TTA AGT				1249
Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln Asn Thr Ile Glu Leu Ser				
	405	410	415	
GTT CCA ACG GGT GAA GGA AAT ATG AAT AAA GTT GCG CCA ATG ATT GGC				1297
Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys Val Ala Pro Met Ile Gly				
	420	425	430	
AAC ATT TAT CTT AGC TCA AAT GAA AAT AAT GCT GAT AAG ATC CCC GGC				1345
Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn Ala Asp Lys Ile Pro Gly				
	435	440	445	
TAC CGT CGA CCC GGT ACA TTT TTA TAA				1372
Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu ***				
450	455			

【0038】

【配列表】

配列番号：2

配列の長さ：456

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met	His	Tyr	Phe	Arg	Arg	Asn	Cys	Ile	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Leu
1				5				10				15			
Tyr	Gly	Thr	Asn	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Thr	Ser	Arg	Glu
			20					25				30			
Val	Val	Ser	Ser	Val	Gln	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Thr	Phe	Tyr	Leu
			35					40				45			
Cys	Pro	Pro	Pro	Val	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Cys
	50					55					60				
Met	Ser	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Thr	Gln
65				70						75				80	
Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Asn	Ala	Lys	Ala
				85						90				95	
Met	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ala	Ser	Leu
			100					105				110			
Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ala	Glu	Thr	Val	Asn	Asn	Asn	Leu	Asn	Ala
		115						120				125			
Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Lys	Met	Ala	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile
		130					135					140			
Asn	Gln	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Asn	Glu	His	Pro	Asn
145				150						155			160		
Leu	Val	Glu	Ala	Tyr	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Gln	Arg	Ala

165	170	175
Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg Asn		
180	185	190
Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys Thr		
195	200	205
Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile Thr		
210	215	220
Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu Gln		
225	230	235
Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val Ile		
245	250	255
Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn Val		
260	265	270
Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr Pro		
275	280	285
Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Trp Asn Gly Asp Glu Pro		
290	295	300
Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser Trp		
305	310	315
Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe Ser		
325	330	335
Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu Val		
340	345	350
Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn Asn		
355	360	365
Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn Asn		
370	375	380
Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp Glu Ile Lys Val Ala Lys		
385	390	395
		400

Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln Asn Thr Ile Glu Leu Ser  
 405 410 415  
 Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys Val Ala Pro Met Ile Gly  
 420 425 430  
 Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn Ala Asp Lys Ile Pro Gly  
 435 440 445  
 Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu  
 450 455

【0039】

【配列表】

配列番号：3

配列の長さ：3264

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 ハイブリッドDNA (40K-C)

配列

ATG CAC TAT TTT AGG CGG AAT TGC ATA TTT TTC CTT ATA GTT ATT CTA	48
Met His Tyr Phe Arg Arg Asn Cys Ile Phe Phe Leu Ile Val Ile Leu	
1 5 10 15	
TAT GGT ACG AAC TCA TCT CCG AGT ACC CAA AAT GTG ACA TCA AGA GAA	96
Tyr Gly Thr Asn Ser Ser Pro Ser Thr Gln Asn Val Thr Ser Arg Glu	
20 25 30	
GTT GTT TCG AGC GTC CAG TTG TCT GAG GAA GAG TCT ACG TTT TAT CTT	144
Val Val Ser Ser Val Gln Leu Ser Glu Glu Glu Ser Thr Phe Tyr Leu	
35 40 45	
TGT CCC CCA CCA GTG GGT TCA ACC GTG ATC CGT CTA GAA CCG CCG CGA	192

Cys	Pro	Pro	Pro	Val	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Arg	Leu	Glu	Pro	Pro	Arg	
50						55						60				
AAA	TGT	CCC	GAA	CCT	AGA	AAA	GCC	ACC	GAG	TGG	GGT	GAA	GGA	ATC	GCG	240
Lys	Cys	Pro	Glu	Pro	Arg	Lys	Ala	Thr	Glu	Trp	Gly	Glu	Gly	Ile	Ala	
65						70						75			80	
ATA	TTA	TTT	AAA	GAG	AAT	ATC	AGT	CCA	TAT	AAA	TTT	AAA	GTG	ACG	CTT	288
Ile	Leu	Phe	Lys	Glu	Asn	Ile	Ser	Pro	Tyr	Lys	Phe	Lys	Val	Thr	Leu	
					85										95	
TAT	TAT	AAA	AAT	ATC	ATT	CAG	ACG	ACG	ACA	TGG	ACG	GGG	ACG	ACA	TAT	336
Tyr	Tyr	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln	Thr	Thr	Thr	Trp	Thr	Gly	Thr	Thr	Tyr	
			100						105						110	
AGA	CAG	ATC	ACT	AAT	CGA	TAT	ACA	GAT	AGG	ACG	CCC	GTT	TCC	ATT	GAA	384
Arg	Gln	Ile	Thr	Asn	Arg	Tyr	Thr	Asp	Arg	Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Glu	
			115						120						125	
GAG	ATC	ACG	GAT	CTA	ATC	GAC	GGC	AAA	GGA	AGA	TGC	TCA	TCT	AAA	GCA	432
Glu	Ile	Thr	Asp	Leu	Ile	Asp	Gly	Lys	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Lys	Ala	
			130						135						140	
AGA	TAC	CTT	AGA	AAC	AAT	GTA	TAT	GTT	GAA	GCG	TTT	GAC	AGG	GAT	GCG	480
Arg	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Val	Tyr	Val	Glu	Ala	Phe	Asp	Arg	Asp	Ala	
145						150						155			160	
GGA	GAA	AAA	CAA	GTA	CTT	CTA	AAA	CCA	TCA	AAA	TTC	AAC	ACG	CCC	GAA	528
Gly	Glu	Lys	Gln	Val	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Lys	Phe	Asn	Thr	Pro	Glu	
						165									175	
TCT	AGG	GCA	TGG	CAC	ACG	ACT	AAT	GAG	ACG	TAT	ACC	GTG	TGG	GGA	TCA	576
Ser	Arg	Ala	Trp	His	Thr	Thr	Asn	Glu	Thr	Tyr	Thr	Val	Trp	Gly	Ser	
						180									190	
CCA	TGG	ATA	TAT	CGA	ACG	GGA	ACC	TCC	GTC	AAT	TGT	ATA	GTA	GAG	GAA	624
Pro	Trp	Ile	Tyr	Arg	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Asn	Cys	Ile	Val	Glu	Glu	
			195						200						205	

ATG GAT GCC CGC TCT GTG TTT CCG TAT TCA TAT TTT GCA ATG GCC AAT	672
Met Asp Ala Arg Ser Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Phe Ala Met Ala Asn	
210 215 220	
GGC GAC ATC GCG AAC ATA TCT CCA TTT TAT GGT CTA TCC CCA CCA GAG	720
Gly Asp Ile Ala Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Gly Leu Ser Pro Pro Glu	
220 225 230 235	
GCT GCC GCA GAA CCC ATG GGA TAT CCC CAG GAT AAT TTC AAA CAA CTA	768
Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Tyr Pro Gln Asp Asn Phe Lys Gln Leu	
240 245 250	
GAT AGC TAT TTT TCA ATG GAT TTG GAC AAG CGT CGA AAA GCA AGC CTT	816
Asp Ser Tyr Phe Ser Met Asp Leu Asp Lys Arg Arg Lys Ala Ser Leu	
255 260 265	
CCA GTC AAG CGT AAC TTT CTC ATC ACA TCA CAC TTC ACA GTT GGG TGG	864
Pro Val Lys Arg Asn Phe Leu Ile Thr Ser His Phe Thr Val Gly Trp	
270 275 280	
GAC TGG GCT CCA AAA ACT ACT CGT GTA TGT TCA ATG ACT AAG TGG AAA	912
Asp Trp Ala Pro Lys Thr Thr Arg Val Cys Ser Met Thr Lys Trp Lys	
285 290 295	
GAG GTG ACT GAA ATG TTG CGT GCA ACA GTT AAT GGG AGA TAC AGA TTT	960
Glu Val Thr Glu Met Leu Arg Ala Thr Val Asn Gly Arg Tyr Arg Phe	
300 305 310 315	
ATG GCC CGT GAA CTT TCG GCA ACG TTT ATC AGT AAT ACG ACT GAG TTT	1008
Met Ala Arg Glu Leu Ser Ala Thr Phe Ile Ser Asn Thr Thr Glu Phe	
320 325 330	
GAT CCA AAT CGC ATC ATA TTA GGA CAA TGT ATT AAA CGC GAG GCA GAA	1056
Asp Pro Asn Arg Ile Ile Leu Gly Gln Cys Ile Lys Arg Glu Ala Glu	
335 340 345	
GCA GCA ATC GAG CAG ATA TTT AGG ACA AAA TAT AAT GAC AGT CAC GTC	1105
Ala Ala Ile Glu Gln Ile Phe Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Ser His Val	

350	355	360	
AAG GTT GGA CAT GTA CAA TAT TTC TTG GCT CTC GGG GGA TTT ATT GTA			1153
Lys Val Gly His Val Gln Tyr Phe Leu Ala Leu Gly Gly Phe Ile Val			
365	370	375	
GCA TAT CAG CCT GTT CTA TCC AAA TCC CTG GCT CAT ATG TAC CTC AGA			1201
Ala Tyr Gln Pro Val Leu Ser Lys Ser Leu Ala His Met Tyr Leu Arg			
380	385	390	395
GAA TTG ATG AGA GAC AAC AGG ACC GAT GAG ATG CTC GAC CTG GTA AAC			1249
Glu Leu Met Arg Asp Asn Arg Thr Asp Glu Met Leu Asp Leu Val Asn			
400	405	410	
AAT AAG CAT GCA ATT TAT AAG AAA AAT GCT ACC TCA TTG TCA CGA TTG			1297
Asn Lys His Ala Ile Tyr Lys Lys Asn Ala Thr Ser Leu Ser Arg Leu			
415	420	425	
CGG CGA GAT ATT CGA AAT GCA CCA AAT AGA AAA ATA ACA TTA GAC GAC			1345
Arg Arg Asp Ile Arg Asn Ala Pro Asn Arg Lys Ile Thr Leu Asp Asp			
430	435	440	
ACC ACA GCT ATT AAA TCG ACA TCG TCT GTT CAA TTC GCC ATG CTC CAA			1393
Thr Thr Ala Ile Lys Ser Thr Ser Ser Val Gln Phe Ala Met Leu Gln			
445	450	455	
TTT CTT TAT GAT CAT ATA CAA ACC CAT ATT AAT GAT ATG TTT AGT AGG			1441
Phe Leu Tyr Asp His Ile Gln Thr His Ile Asn Asp Met Phe Ser Arg			
460	465	470	475
ATT GCC ACA GCT TGG TGC GAA TTG CAG AAT AGA GAA CTT GTT TTA TGG			1489
Ile Ala Thr Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn Arg Glu Leu Val Leu Trp			
480	485	490	
CAC GAA GGG ATA AAG ATT AAT CCT AGC GCT ACA GCG AGT GCA ACA TTA			1537
His Glu Gly Ile Lys Ile Asn Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ala Thr Leu			
495	500	505	
GGA AGG AGA GTG GCT GCA AAG ATG TTG GGG GAT GTC GCT GCT GTA TCG			1585



Gly Arg Arg Val Ala Ala Lys Met Leu Gly Asp Val Ala Ala Val Ser	
510 515 520	
AGC TGC ACT GCT ATA GAT GCG GAA TCC GTC ACT TTG CAA AAT TCT ATG	1633
Ser Cys Thr Ala Ile Asp Ala Glu Ser Val Thr Leu Gln Asn Ser Met	
525 530 535	
CGA GTT ATC ACA TCC ACT AAT ACA TGT TAT AGC CGA CCA TTG GTT CTA	1681
Arg Val Ile Thr Ser Thr Asn Thr Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Leu	
540 545 550 555	
TTT TCA TAT GGA GAA AAC CAA GGA AAC ATA CAG GGA CAA CTC GGT GAA	1729
Phe Ser Tyr Gly Glu Asn Gln Gly Asn Ile Gln Gly Gln Leu Gly Glu	
560 565 570	
AAC AAC GAG TTG CTT CCA ACG CTA GAG GCT GTA GAG CCA TGC TCG GCT	1777
Asn Asn Glu Leu Leu Pro Thr Leu Glu Ala Val Glu Pro Cys Ser Ala	
575 580 585	
AAT CAT CGT AGA TAT TTT CTG TTT GGA TCC GGT TAT GCT TTA TTT GAA	1825
Asn His Arg Arg Tyr Phe Leu Phe Gly Ser Gly Tyr Ala Leu Phe Glu	
590 595 600	
AAC TAT AAT TTT GTT AAG ATG GTA GAC GCT GCC GAT ATA CAG ATT GCT	1873
Asn Tyr Asn Phe Val Lys Met Val Asp Ala Ala Asp Ile Gln Ile Ala	
605 610 615	
AGC ACA TTT GTC GAG CTT AAT CTA ACC CTG CTA GAA GAT CGG GAA ATT	1921
Ser Thr Phe Val Glu Leu Asn Leu Thr Leu Leu Glu Asp Arg Glu Ile	
620 625 630 635	
TTG CCT TTA TCC GTT TAC ACA AAA GAA GAG TTG CGT GAT GTT GGT GTA	1969
Leu Pro Leu Ser Val Tyr Thr Lys Glu Glu Leu Arg Asp Val Gly Val	
640 645 650	
TTG GAT TAT GCA GAA GTA GCT CGC CGC AAT CAA CTA CAT GAA CTT AAA	2017
Leu Asp Tyr Ala Glu Val Ala Arg Arg Asn Gln Leu His Glu Leu Lys	
655 660 665	

TTT TAT GAC ATA AAC AAA GTA ATA GAA GTG GAT ACA AAT TAC GCG GGG	2065
Phe Tyr Asp Ile Asn Lys Val Ile Glu Val Asp Thr Asn Tyr Ala Gly	
670 675 680	
CTG CAG GAA TTC GGC TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAT GCA AAC CCA	2113
Leu Gln Glu Phe Gly Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro	
685 690 695	
AAT AAT GGC CAA ACC CAA TTA GAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACA GAT	2161
Asn Asn Gly Gln Thr Gln Leu Glu Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp	
700 705 710 715	
CTA ATC AAT GCT AAA GCG ATG ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCC	2209
Leu Ile Asn Ala Lys Ala Met Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala	
720 725 730	
AAG ATT GAA GCT AGT TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA GCT GAA ACA GTT	2257
Lys Ile Glu Ala Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val	
735 740 745	
AAC AAT AAC CTT AAT GCA ACA TTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT	2305
Asn Asn Asn Leu Asn Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr	
750 755 760	
AAT TTA GAA TCA GCC ATC AAC CAA GCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT	2353
Asn Leu Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe	
765 770 775	
GAT AAT GAA CAC CCA AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC	2401
Asp Asn Glu His Pro Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr	
780 785 790 795	
ACT TTA GAA CAA CGT GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTG TCA TCA ACT GCT	2449
Thr Leu Glu Gln Arg Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala	
800 805 810	
TAT AAT CAA ATT CGC AAT AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAA GCT AGT	2497
Tyr Asn Gln Ile Arg Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser	

815	820	825	
AGT TTA ATA ACT AAA ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ACG CTT TTA			2545
Ser Leu Ile Thr Lys Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu			
830	835	840	
GAT TCT AAT GAG ATT ACT ACA GCT AAT AAG AAT ATT AAT AAT ACG TTA			2593
Asp Ser Asn Glu Ile Thr Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu			
845	850	855	
TCA ACT ATT AAT GAA CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT			2641
Ser Thr Ile Asn Glu Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser			
860	865	870	875
TTT ATT AAA AAA GTG ATT CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT			2689
Phe Ile Lys Lys Val Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr			
880	885	890	
TTT ACA AAC GCT AAT GTT CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT			2737
Phe Thr Asn Ala Asn Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe			
895	900	905	
AGT GCT GAT GTA ACA CCC GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT			2785
Ser Ala Asp Val Thr Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val			
910	915	920	
TGG AAT GGT GAT GAA CCT TCA AGT AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT			2833
Trp Asn Gly Asp Glu Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser			
925	930	935	
ATC ACA GAT GTT TCT TGG ATT TAT AGT TTA GCT GGA ACA AAC ACG AAG			2881
Ile Thr Asp Val Ser Trp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys			
940	945	950	955
TAC CAA TTT AGT TTT AGC AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT			2929
Tyr Gln Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr			
960	965	970	
TTC CCT TAT AAG TTG GTT AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA			2977

Phe Pro Tyr Lys Leu Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu	
975	980
985	
CAA TAC AAA TTA AAT AAT GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT	3025
Gln Tyr Lys Leu Asn Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr	
990	995
1000	
TCA ACT AGT GCA AAT AAT ACT ACA GCT AAT CCA ACT CCA GCA GTT GAT	3073
Ser Thr Ser Ala Asn Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp	
1005	1010
1015	
GAG ATT AAA GTT GCT AAA ATC GTT TTA TCA GGT TTA AGA TTT GGC CAA	3121
Glu Ile Lys Val Ala Lys Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln	
1020	1025
1030	1035
AAC ACA ATC GAA TTA AGT GTT CCA ACG GGT GAA GGA AAT ATG AAT AAA	3169
Asn Thr Ile Glu Leu Ser Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys	
1040	1045
1050	
GTT GCG CCA ATG ATT GGC AAC ATT TAT CTT AGC TCA AAT GAA AAT AAT	3217
Val Ala Pro Met Ile Gly Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn	
1055	1060
1065	
GCT GAT AAG ATC CCC GGG TAC CGT CGA CCC GGT ACA TTT TTA TAA	3264
Ala Asp Lys Ile Pro Gly Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu ***	
1070	1075
1080	

【0040】

【配列表】

配列番号：4

配列の長さ：1080

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met	His	Tyr	Phe	Arg	Arg	Asn	Cys	Ile	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Leu
1				5					10					15	
Tyr	Gly	Thr	Asn	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Thr	Ser	Arg	Glu
			20					25					30		
Val	Val	Ser	Ser	Val	Gln	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Thr	Phe	Tyr	Leu
			35				40					45			
Cys	Pro	Pro	Pro	Val	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Arg	Leu	Glu	Pro	Pro	Arg
	50					55				60					
Lys	Cys	Pro	Glu	Pro	Arg	Lys	Ala	Thr	Glu	Trp	Gly	Glu	Gly	Ile	Ala
65					70					75				80	
Ile	Leu	Phe	Lys	Glu	Asn	Ile	Ser	Pro	Tyr	Lys	Phe	Lys	Val	Thr	Leu
			85					90					95		
Tyr	Tyr	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln	Thr	Thr	Thr	Trp	Thr	Gly	Thr	Thr	Tyr
			100					105					110		
Arg	Gln	Ile	Thr	Asn	Arg	Tyr	Thr	Asp	Arg	Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Glu
			115					120					125		
Glu	Ile	Thr	Asp	Leu	Ile	Asp	Gly	Lys	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Lys	Ala
			130				135						140		
Arg	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Val	Tyr	Val	Glu	Ala	Phe	Asp	Arg	Asp	Ala
145					150					155				160	
Gly	Glu	Lys	Gln	Val	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Lys	Phe	Asn	Thr	Pro	Glu
			165					170					175		
Ser	Arg	Ala	Trp	His	Thr	Thr	Asn	Glu	Thr	Tyr	Thr	Val	Trp	Gly	Ser
			180					185					190		
Pro	Trp	Ile	Tyr	Arg	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Asn	Cys	Ile	Val	Glu	Glu
			195					200					205		
Met	Asp	Ala	Arg	Ser	Val	Phe	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Ala	Met	Ala	Asn
210							215						220		

Gly Asp Ile Ala Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Gly Leu Ser Pro Pro Glu  
220 225 230 235  
Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Tyr Pro Gln Asp Asn Phe Lys Gln Leu  
240 245 250  
Asp Ser Tyr Phe Ser Met Asp Leu Asp Lys Arg Arg Lys Ala Ser Leu  
255 260 265  
Pro Val Lys Arg Asn Phe Leu Ile Thr Ser His Phe Thr Val Gly Trp  
270 275 280  
Asp Trp Ala Pro Lys Thr Thr Arg Val Cys Ser Met Thr Lys Trp Lys  
285 290 295  
Glu Val Thr Glu Met Leu Arg Ala Thr Val Asn Gly Arg Tyr Arg Phe  
300 305 310 315  
Met Ala Arg Glu Leu Ser Ala Thr Phe Ile Ser Asn Thr Thr Glu Phe  
320 325 330  
Asp Pro Asn Arg Ile Ile Leu Gly Gln Cys Ile Lys Arg Glu Ala Glu  
335 340 345  
Ala Ala Ile Glu Gln Ile Phe Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Ser His Val  
350 355 360  
Lys Val Gly His Val Gln Tyr Phe Leu Ala Leu Gly Gly Phe Ile Val  
365 370 375  
Ala Tyr Gln Pro Val Leu Ser Lys Ser Leu Ala His Met Tyr Leu Arg  
380 385 390 395  
Glu Leu Met Arg Asp Asn Arg Thr Asp Glu Met Leu Asp Leu Val Asn  
400 405 410  
Asn Lys His Ala Ile Tyr Lys Lys Asn Ala Thr Ser Leu Ser Arg Leu  
415 420 425  
Arg Arg Asp Ile Arg Asn Ala Pro Asn Arg Lys Ile Thr Leu Asp Asp  
430 435 440  
Thr Thr Ala Ile Lys Ser Thr Ser Ser Val Gln Phe Ala Met Leu Gln

445	450	455	
Phe Leu Tyr Asp His Ile Gln Thr His Ile Asn Asp Met Phe Ser Arg			
460	465	470	475
Ile Ala Thr Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn Arg Glu Leu Val Leu Trp			
	480	485	490
His Glu Gly Ile Lys Ile Asn Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ala Thr Leu			
	495	500	505
Gly Arg Arg Val Ala Ala Lys Met Leu Gly Asp Val Ala Ala Val Ser			
	510	515	520
Ser Cys Thr Ala Ile Asp Ala Glu Ser Val Thr Leu Gln Asn Ser Met			
	525	530	535
Arg Val Ile Thr Ser Thr Asn Thr Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Leu			
540	545	550	555
Phe Ser Tyr Gly Glu Asn Gln Gly Asn Ile Gln Gly Gln Leu Gly Glu			
	560	565	570
Asn Asn Glu Leu Leu Pro Thr Leu Glu Ala Val Glu Pro Cys Ser Ala			
	575	580	585
Asn His Arg Arg Tyr Phe Leu Phe Gly Ser Gly Tyr Ala Leu Phe Glu			
	590	595	600
Asn Tyr Asn Phe Val Lys Met Val Asp Ala Ala Asp Ile Gln Ile Ala			
	605	610	615
Ser Thr Phe Val Glu Leu Asn Leu Thr Leu Leu Glu Asp Arg Glu Ile			
620	625	630	635
Leu Pro Leu Ser Val Tyr Thr Lys Glu Glu Leu Arg Asp Val Gly Val			
	640	645	650
Leu Asp Tyr Ala Glu Val Ala Arg Arg Asn Gln Leu His Glu Leu Lys			
	655	660	665
Phe Tyr Asp Ile Asn Lys Val Ile Glu Val Asp Thr Asn Tyr Ala Gly			
	670	675	680

Leu Gln Glu Phe Gly Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro  
 685 690 695  
 Asn Asn Gly Gln Thr Gln Leu Glu Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp  
 700 705 710 715  
 Leu Ile Asn Ala Lys Ala Met Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala  
 720 725 730  
 Lys Ile Glu Ala Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val  
 735 740 745  
 Asn Asn Asn Leu Asn Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr  
 750 755 760  
 Asn Leu Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe  
 765 770 775  
 Asp Asn Glu His Pro Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr  
 780 785 790 795  
 Thr Leu Glu Gln Arg Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala  
 800 805 810  
 Tyr Asn Gln Ile Arg Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser  
 815 820 825  
 Ser Leu Ile Thr Lys Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu  
 830 835 840  
 Asp Ser Asn Glu Ile Thr Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu  
 845 850 855  
 Ser Thr Ile Asn Glu Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser  
 860 865 870 875  
 Phe Ile Lys Lys Val Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr  
 880 885 890  
 Phe Thr Asn Ala Asn Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe  
 895 900 905  
 Ser Ala Asp Val Thr Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val



910	915	920
Trp Asn Gly Asp Glu Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser		
925	930	935
Ile Thr Asp Val Ser Trp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys		
940	945	950
Tyr Gln Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr		
960	965	970
Phe Pro Tyr Lys Leu Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu		
975	980	985
Gln Tyr Lys Leu Asn Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr		
990	995	1000
Ser Thr Ser Ala Asn Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp		
1005	1010	1015
Glu Ile Lys Val Ala Lys Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln		
1020	1025	1030
Asn Thr Ile Glu Leu Ser Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys		
1040	1045	1050
Val Ala Pro Met Ile Gly Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn		
1055	1060	1065
Ala Asp Lys Ile Pro Gly Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu		
1070	1075	1080

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図1】

pNZ40K-Sの構築手順を説明する図である。

【図2】

pNZ40K-Sの構築手順を説明する図である。

【図3】

pNZ40K-Sの構築手順を説明する図である。

【図4】

pNZ40K-Cの構築手順を説明する図である。

【図5】

pNZ40K-Cの構築手順を説明する図である。

【図6】

pNZ40K-Cの構築手順を説明する図である。

【図7】

TTM-1ポリペプチドの発現を確認した結果を示すウエスタンブロットの図である。

【図8】

気管病変スコアを示す図である。

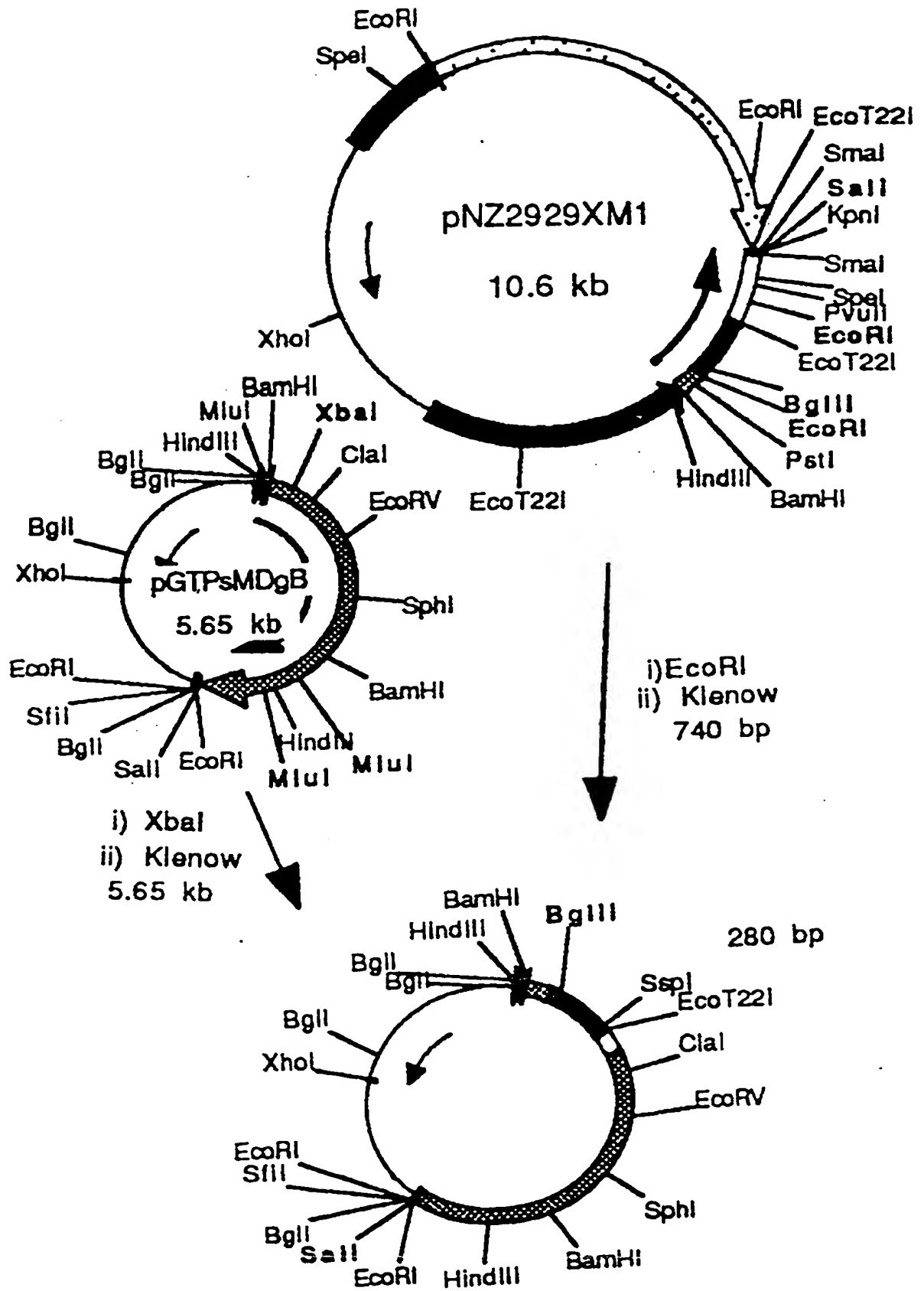
特平 8-103548

【書類名】

図面

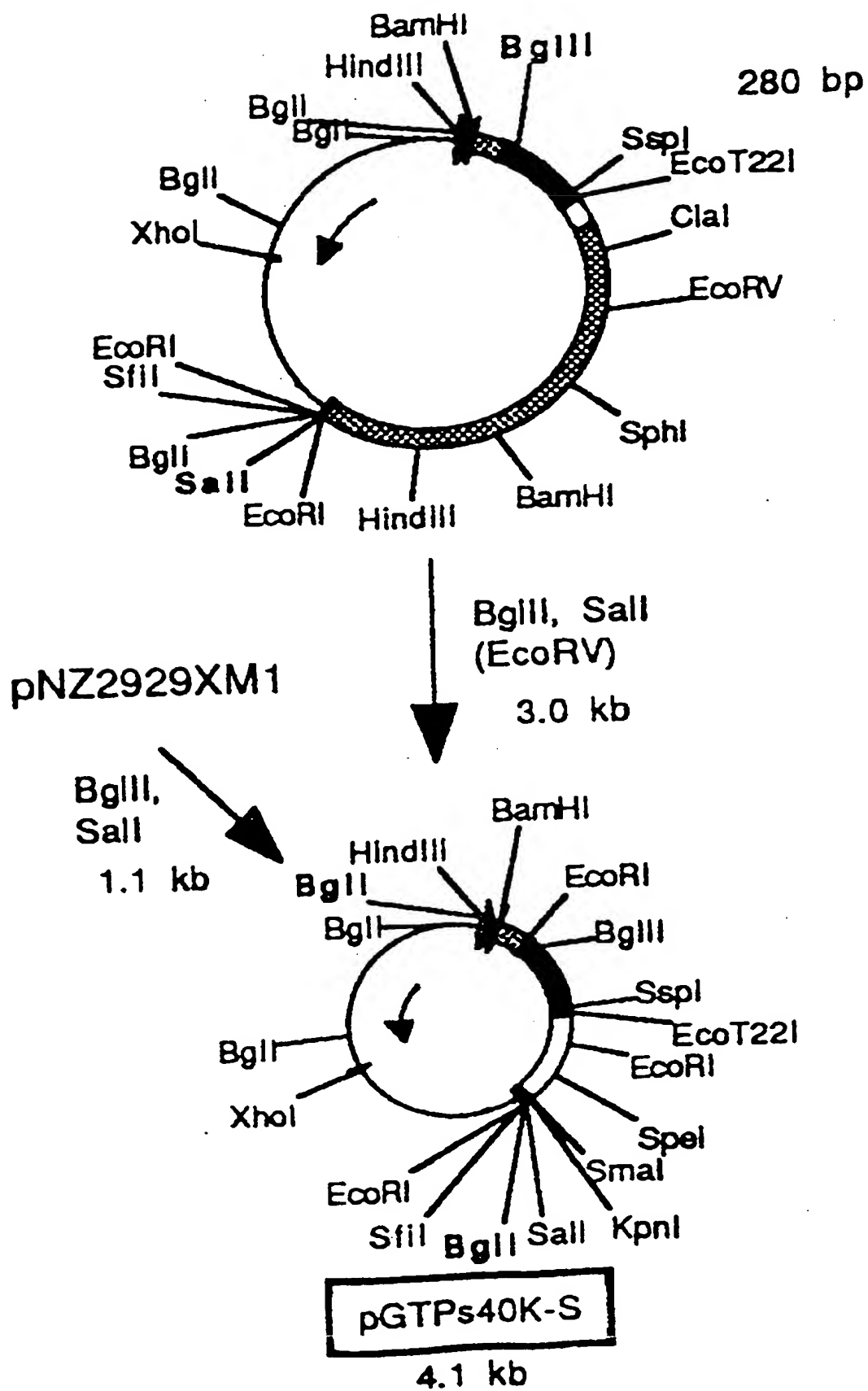
特平 8-103548

【図1】

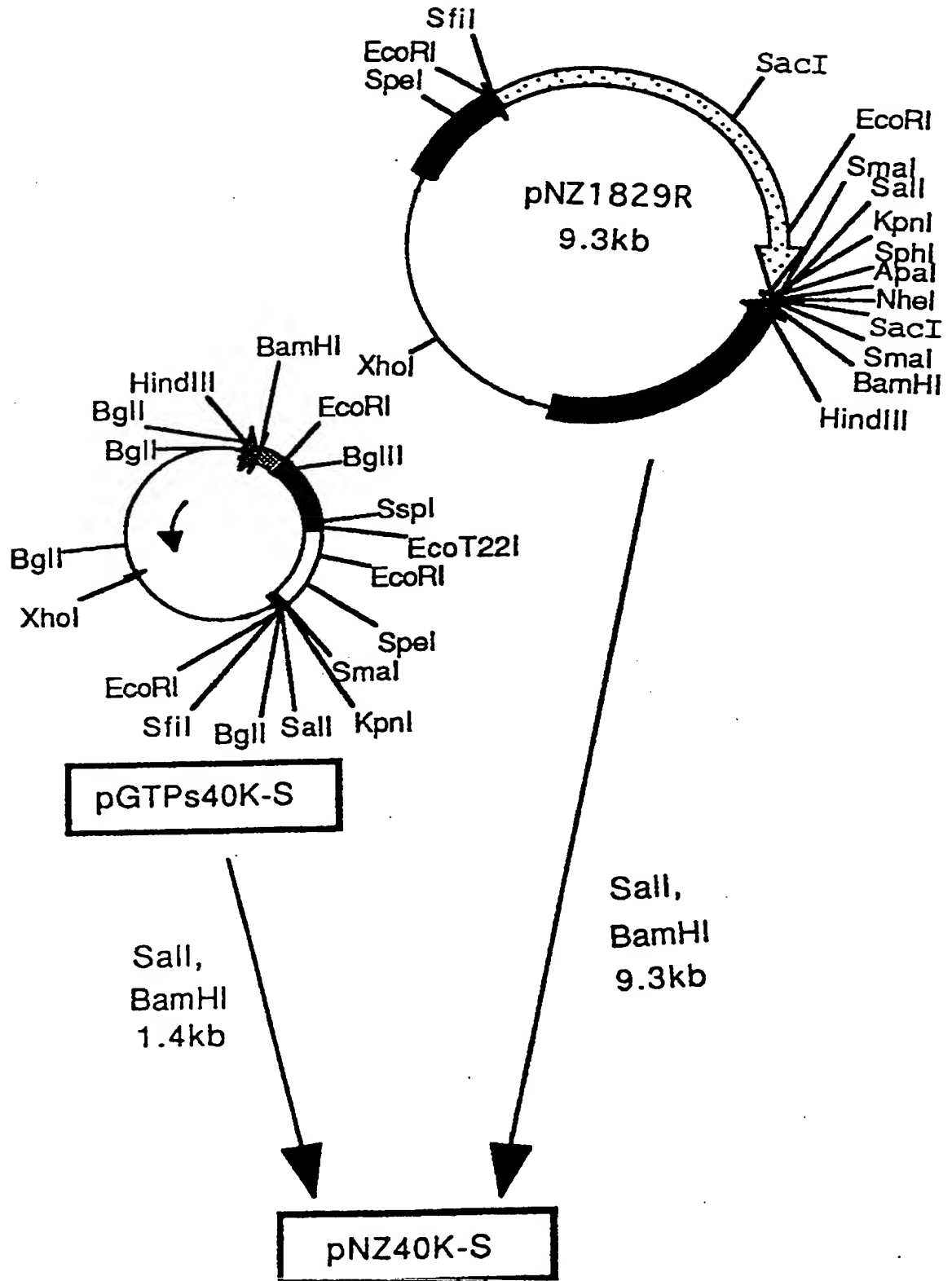


特平 8-103548

【図2】

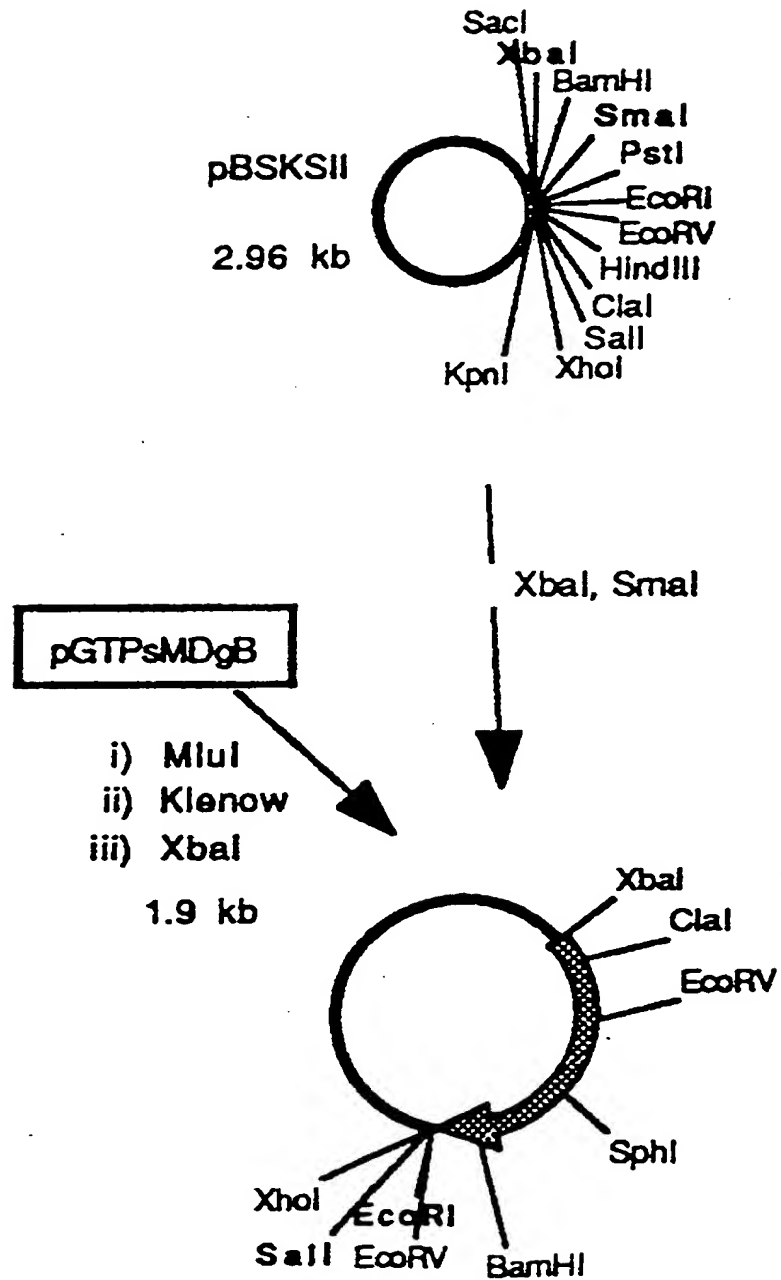


【図3】



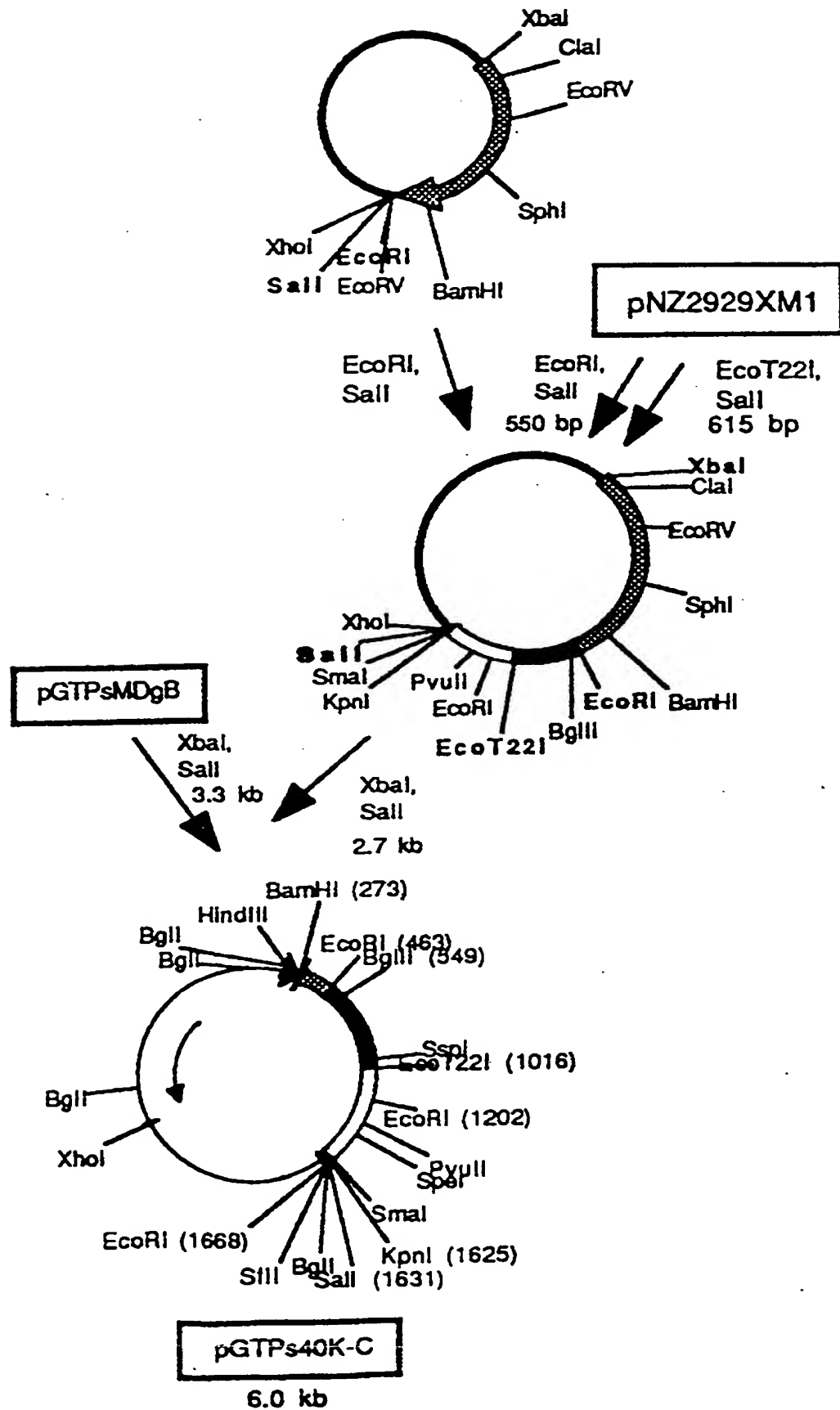


【図4】



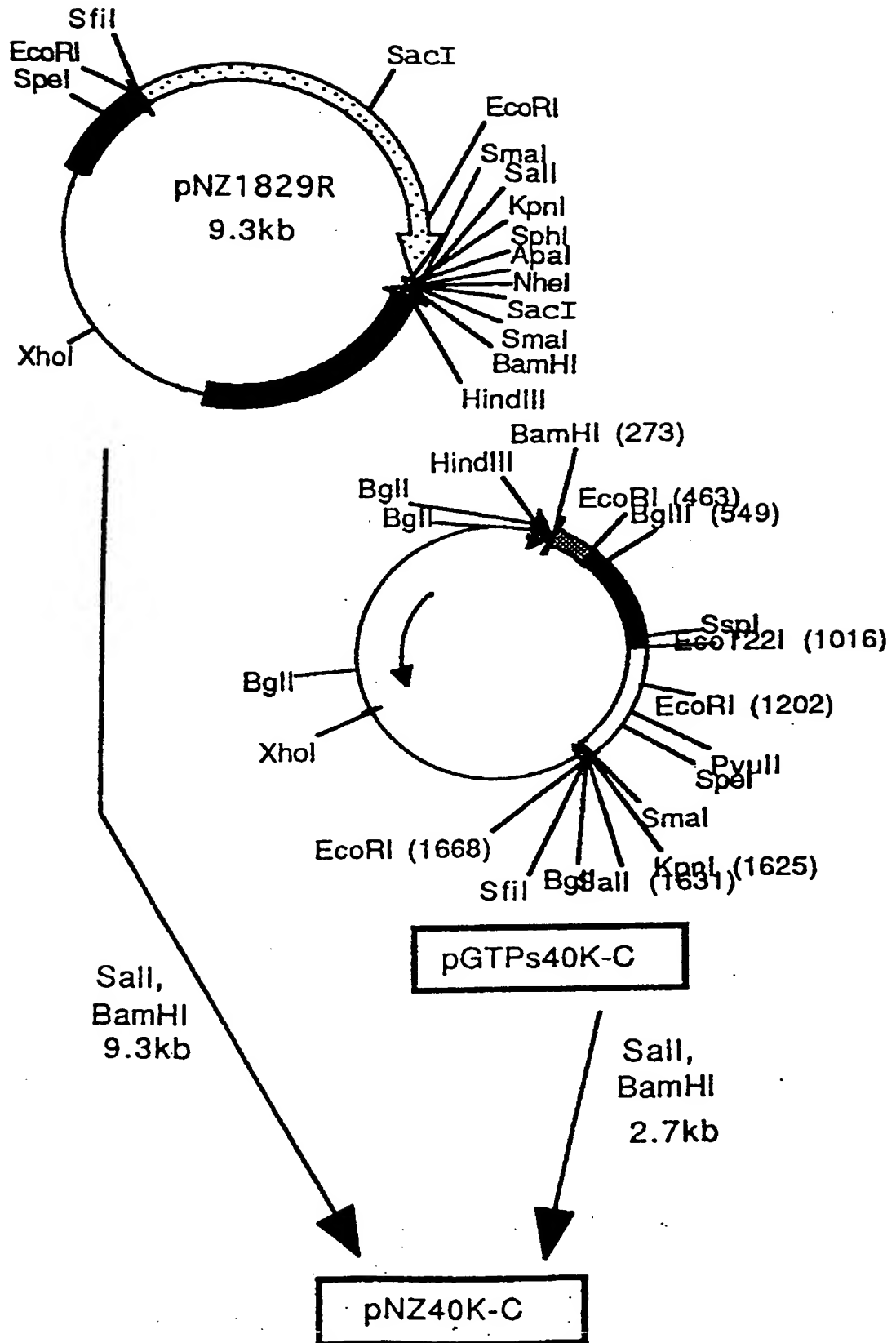
特平 8-103548

【図5】

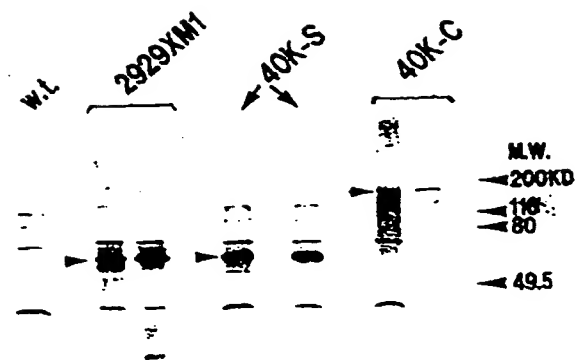


特平 8-103548

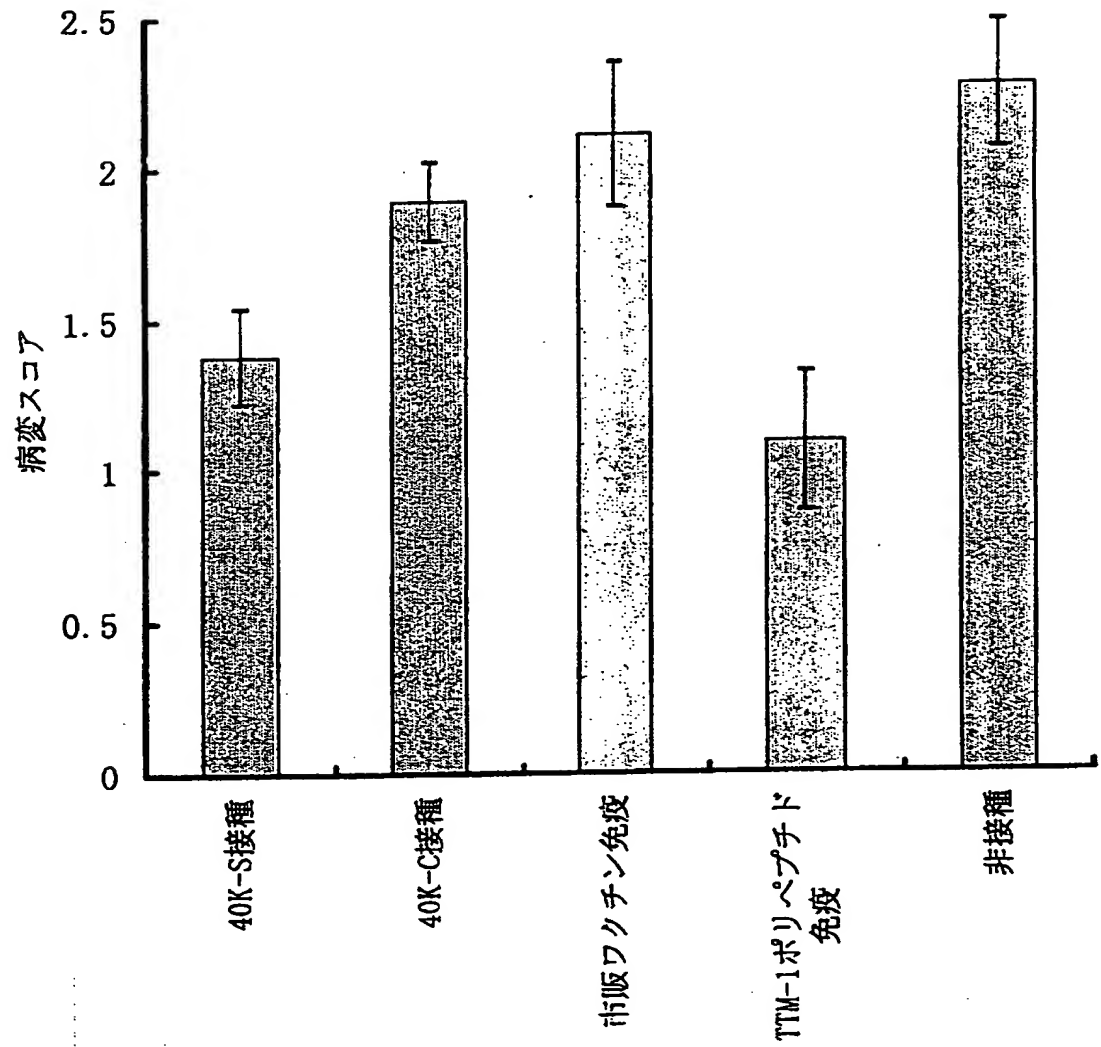
【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗マイコプラズマワクチンとしてより強力な組み換えウイルスを提供する。

【解決手段】 マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドとヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドとを含む融合タンパク質であって、外膜タンパク質由来のペプチドがマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドのN末端側に連結していることを特徴とする融合タンパク質をコードするDNAを作製し、これをアビボックスウイルスの増殖に非必須な領域に組み込んで組み換えアビボックスウイルスを作製する。



特平 8-103548

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000229117

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内2丁目6番1号

【氏名又は名称】

日本ゼオン株式会社

特平 8-103548

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000229117]

1. 変更年月日	1990年 8月22日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区丸の内2丁目6番1号
氏 名	日本ゼオン株式会社